	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10270.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU D METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu D v premixech pro výrobu krmných směsí metodou HPLC.

2 Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní hydroxidem draselným za studena přes noc a vitamín D se extrahuje do hexanu. Extrakt se přečistí na semipreparativní koloně, eluát se převede do methanolu a obsah vitamínu D se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 264 nm.


Poznámky

1 Vitamín D_3 je po chemické stránce 9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol, vitamín D_2 9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-3-ol. Mezinárodní jednotka vitamínu D odpovídá aktivitě 0,025 μg vitamínu D.

3 Chemikálie

Všechny chemikálie jsou čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.


- 1 Hexan, nebo cyklohexan.
- 2 Methanol, HPLC grade.
- 3 Acetonitril, HPLC grade.
- 4 Cyklohexan, HPLC grade.
- 5 2-propanol, HPLC grade.
- 6 Ethanol, denaturovaný hexanem 1 %.
- 7 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, vodný roztok 35%, $\rho(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 0,945 \text{ g/ml}$.
Příprava: Smíchá se 764 ml ethanolu (6), 1036 ml vody (23) a 1,8 g kyseliny askorbové (12).
- 9 Hydroxid draselný, KOH.
- 10 Hydroxid draselný, KOH, vodný roztok, $c(\text{KOH}) = 600 \text{ g/l}$.
Příprava: Do kádinky se naváží 600 g KOH (9), rozpustí ve vodě (23), nechá se vychladit na laboratorní teplotu, převede se 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (23) po značku.
- 11 Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA - Chelaton III).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10270.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou HPLC	Revize	1

- 12 Kyselina askorbová, C₆H₈O₆.
- 13 Hydrochinon pevný, C₆H₆O₂.
- 14 Síran sodný, Na₂SO₄, bezvodý.
- 15 Indikátor fenolftalein, roztok 0,1%.
Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml ethanolu a doplní vodou (23) do 100 ml. Takto připravený roztok se zředí desetkrát vodou (23).
- 16 Mobilní fáze pro analytickou kolonu: methanol (2) : acetonitril (3), 50 : 50 (v/v).
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se vlije 500 ml methanolu (2) a doplní acetonitrilem (3) po značku.
- 17 Mobilní fáze pro semipreparativní kolonu: 1,5 % 2-propanolu (5) v cyklohexanu (4).
Příprava: Do 1000ml baňky se odpipetuje 15 ml 2-propanolu (5) a doplní cyklohexanem (4) po značku.
- 18 Chlorid sodný, NaCl, nasycený vodný roztok.
- 19 Vitamín D₂, ergocalciferol, standardní substance.
- 20 Vitamín D₃, cholecalciferol, standardní substance.
- 21 Roztok vitamínu D₃ k semipreparaci.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se vnese navážka 0,025 g vitamínu D₃ (20) a rozpustí v cyklohexanu (4). Z takto připraveného roztoku se pipetuje 500 µl do 25ml odměrné baňky, doplní cyklohexanem (4) po značku a promíchá.
- 22 Roztok vnitřního standardu vitamínu D₂.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se vnese navážka 0,025 g vitamínu D₂ (19) a rozpustí v ethanolu (6). Získá se roztok o koncentraci 10 000 m.j./ml.
- 23 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 24 Dusík 4,0.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy.
- 2 Kapalinový chromatograf s UV detektorem.
- 3 Kolony pro semipreparaci a vlastní stanovení.
- 4 Rotační vakuová odparka.
- 5 Rotační třepačka uzavřená, bez přístupu denního světla (30 ot/min).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10270.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou HPLC	Revize	1

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se mele na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Vzorek se upravuje těsně před jeho zmýdelněním a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám vitamínu.

Poznámky


- 2 *Roztoky vitamínu D se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Chrání se hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, který nepropouští UV-záření. Roztoky jsou citlivé na oxidační a kyselé látky. Při úpravě vzorku nesmí dojít k jeho přehřátí.*

5.2 Zmýdelnění vzorku

Do 1000ml kónické baňky se zábrusem se naváží 40 g vzorku s přesností na 0,01g a přidá se 160 ml ethanolu (6). Postupně se přidá 500 mg EDTA (11), 750 mg kyseliny askorbové (12), 500 mg pevného hydrochinonu (13) a doplní se na objem 200 ml roztokem hydroxidu draselného (10). Podle deklarovaného obsahu vitamínu D₃ se přidá roztok vitamínu D₂ (22) jako vnitřní standard. Baňka se uzavře polyethylenovou zátkou, nasadí do rotační třepačky a zmýdelňuje se po dobu 14 h až 16 h při laboratorní teplotě.

5.3 Extrakce

Do 250ml dělicí nálevky se nalije 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (18), 30 ml vody (23) a 50,0 ml zmýdelněného roztoku. Do dělicí nálevky se zmýdelněný roztok převede tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Přidá se 50,0 ml hexanu (1). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se po dobu 30 s. Obě fáze se nechají asi 2 až 5 min v klidu, aby se rozdělily. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml ethanolu (7) k rozrušení vzniklé emulze. Extrakce vodné fáze s hexanem se opakuje ještě třikrát tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (1) a poté 2 × opět s 40 ml hexanu (1), přičemž po rozdělení fází se hexanové extrakty spojují v 250ml dělicí nálevce. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá ethanol (7). Spojené extrakty se propláchnou 100 ml vody (23), přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchnou dvakrát 100 ml vody (23), přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží tak dlouho, až má promývací voda neutrální reakci, tj. po přidání roztoku fenolftaleinu (15) zůstává roztok bezbarvý. Extrakt se filtruje do 200ml odměrné baňky přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (14). Nálevka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (1) a odměrná baňka se doplní hexanem (1) po značku a promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10270.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou HPLC	Revize	1

Poznámky

3 *Touto uvedenou metodou lze stanovit obsah vitamínu D v sušeném mléce.*

Do 1000ml kónické baňky se zábrusem se naváží 50 g sušeného mléka s přesností na 0,01 g, přidá se 160 ml ethanolu (6) a vzorek se rozmíchá. Postupně se přidá 500 mg EDTA (11), 750 mg kyseliny askorbové (12) a 500 mg pevného hydrochinonu (13). Doplní se na objem 200 ml roztokem hydroxidu draselného (10). Baňka se uzavře polyethylenovou zátkou, nasadí do rotační třepačky a zmydluje se 16 h při laboratorní teplotě.


Vitamín D se extrahuje podle 5.3 s tím, že se pipetuje 100,0 ml hydrolyzátu a jednotlivé frakce hexanu se jímají v odpařovací baňce s kulatým dnem a poté se odpaří na vakuové odparce při teplotě 45 °C na objem asi 50 ml. Získaná hexanová frakce se převede kvantitativně hexanem (1) do 100ml odměrné baňky. Dále se postupuje podle 5.4.

5.4 Semipreparace frakce vitamínu D

Na kondicionovanou semipreparativní kolonu se nanese 2000 µl pracovního roztoku standardu vitamínu D (21) v cyklohexanu (4) a sleduje se retenční čas vitamínu D. Pak se na kolonu nanese 2000 µl extraktu získaného podle 5.3 a sbírá se frakce vitamínu D po dobu 40 s před a po retenčním čase vitamínu D. Takto získaný eluát se odpaří při teplotě 45 °C pod proudem dusíku (24). Odparek se rozpustí v definovaném objemu methanolu (2) a slouží k nástřiku vzorku do sestavy HPLC pro vlastní stanovení vitamínu D.

Tabulka 1. Příklad podmínek semipreparace vitamínu D.

Kolona	Prep NovaPak HR Silica 7,8 mm × 300 mm – nebo obdobná
Mobilní fáze	(17)
Průtok	2,5 ml/min
Teplota	Laboratorní
Objem nástřiku	2000 µl
Vlnová délka detektoru UV při měření	265 nm

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10270.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou HPLC	Revize	1

5.5 Stanovení metodou HPLC

Tabulka 2. Vlastní měření - příklad separačních podmínek.

Kolona	C ₁₈ - Nova-Pak 4 μm, 250 mm × 4,6 mm – nebo obdobná
Mobilní fáze	(16)
Průtok	1 ml/min
Objem nástřiku	75 μl
Vlnová délka detektoru UV při měření	265 nm
Teplota	38 °C
Run Time	14 min

5.6 Kalibrace

Příprava základního a pracovního roztoku

Do 100ml odměrné baňky se vnese navážka 0,025 g vitamínu D₂ (19) a vitamínu D₃ (20), rozpustí v methanolu (2) a doplní methanolem po značku. Z takto připraveného základního roztoku se připraví pracovní roztok naředěním methanolem (2) 100 × (ve dvou krocích).

Příprava kalibračního roztoku a sestavení kalibrační křivky

Do sady 25ml odměrných baněk se odpipetuje postupně (1,0; 2,0; 5,0; 10,0) ml pracovního roztoku vitamínu D (viz výše), doplní se methanolem (2) po značku a promíchá. To odpovídá koncentraci (4000; 8000; 20000; 40000) m.j./l vitamínu D. Takto připravené kalibrační roztoky se nanášejí postupně na chromatografickou kolonu o objemu nástřiku 75 μl . Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestojí kalibrační křivka.

6 Výpočet

Obsah vitamínu D vyjádřený v m.j./kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

kde

c je koncentrace vitamínu odečtená z kalibrační křivky v m.j./l .

m_a hmotnost zkušební vzorku v g,

V objem extraktu v ml,

R ředění resp. zkoncentrování.